

Aus der Kinderklinik  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

---

UNTERSUCHUNGEN ZUR  
MUCOPOLYSACCHARIDAUSSCHIEDUNG  
IM KINDESALTER

Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz,  
den Medizinischen Fachbereichen  
vorgelegt von

JOHANNES OTTE  
aus Bordesholm

Mainz 1975



Aus der Kinderklinik  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

---

UNTERSUCHUNGEN ZUR  
MUCOPOLYSACCHARIDAUSSCHEIDUNG  
IM KINDESALTER

Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz,  
den Medizinischen Fachbereichen  
vorgelegt von



JOHANNES OTTE  
aus Bordesholm

Mainz 1975

Fachbereichsdekan: Prof. Dr. E. Straub

Referent: Prof. Dr. Spranger

Korreferent: Prof. Dr. Prellwitz



## INHALTSVERZEICHNIS

|       |                                                                 |          |
|-------|-----------------------------------------------------------------|----------|
| I.    | EINLEITUNG                                                      | Seite 4  |
| II.   | MATERIAL und METHODIK                                           |          |
|       | A) Untersuchter Personenkreis                                   | Seite 7  |
|       | B) Halbquantitative Suchtests auf sMPS                          | Seite 7  |
|       | 1) BERRY-Test                                                   | Seite 8  |
|       | 2) MPS-Papers-Schnelltest                                       | Seite 8  |
|       | C) Fällung und Reinigung der sMPS                               | Seite 9  |
|       | D) Nachweis der Hexuronsäure                                    | Seite 9  |
|       | E) Nachweis des Dermatansulfates                                | Seite 10 |
|       | F) Weiterverarbeitung positiver Tests                           | Seite 12 |
| III.  | ERGEBNISSE                                                      |          |
|       | A) Vergleich des BERRY-Testes mit dem<br>MPS-Papers Schnelltest | Seite 13 |
|       | B) Hexuronsäureausscheidung                                     | Seite 15 |
|       | C) Dermatansulfatausscheidung                                   | Seite 18 |
|       | D) Pathologische Befunde                                        | Seite 21 |
| IV.   | DISKUSSION                                                      |          |
|       | A) Grobquantitative Suchtests                                   | Seite 26 |
|       | B) Hexuronsäureausscheidung                                     | Seite 27 |
|       | C) Dermatansulfatausscheidung                                   | Seite 29 |
|       | D) Pathologische Befunde                                        | Seite 30 |
|       | E) Schlußbemerkung                                              | Seite 34 |
| V.    | ZUSAMMENFASSUNG                                                 | Seite 35 |
| VI.   | LITERATURVERZEICHNIS                                            | Seite 37 |
| VII.  | LEBENS LAUF                                                     | Seite 48 |
| VIII. | DANKSAGUNG                                                      | Seite 49 |

## I. EINLEITUNG

Mucopolysaccharide sind wichtige Bestandteile des Bindegewebes. Sie werden von Fibroblasten und anderen mesenchymalen Zellen gebildet. Nach ihrem Aufbau werden saure und neutrale Mucopolysaccharide unterschieden. Die sauren Mucopolysaccharide bestehen aus Disaccharideinheiten, die sich in langen unverzweigten Ketten periodisch wiederholen. Die Disaccharideinheiten setzen sich aus einem N-acetylierten (bzw. sulfatierten) Aminosucker und einer Hexuronsäure (bzw. Galaktose beim Keratansulfat) zusammen. Jeweils 40-80 Ketten eines Mucopolysaccharids mit einem Molekulargewicht von 20-30 000 sind mit einem Proteinmolekül verknüpft. Auf diese Weise entstehen Riesenmoleküle mit einem Molekulargewicht bis zu 4 000 000.

Es sind acht verschiedene Typen an Eiweiße gebundener saurer Mucopolysaccharide (sMPS) bekannt, die in Tabelle 1 in der neuen Nomenklatur nach JEANLOZ 1960 zusammengestellt sind.

|                         |          |
|-------------------------|----------|
| 1. Chondroitin-4-Sulfat | (Ch-4-S) |
| 2. Chondroitin-6-Sulfat | (Ch-6-S) |
| 3. Chondroitin          | (Ch)     |
| 4. Dermatansulfat       | (DS)     |
| 5. Heparansulfat        | (HS)     |
| 6. Keratansulfat        | (KS)     |
| 7. Hyaluronsäure        | (HYS)    |
| 8. Heparin              | (H)      |

Tab.1: Nomenklatur der sMPS nach JEANLOZ 1960.

Gesunde Personen scheiden nur geringe Mengen sMPS aus (DI FERRANTE and RICH 1956, TELLER et al. 1962, LAGUNOFF et al. 1967, SPRANGER et al. 1967, WESSLER 1967, JÓSA and SZABÓ 1969, TELLER und KRÜGER 1970). In Abhängigkeit von der angewandten biochemischen Methode und dem Lebensalter der Person variiert die tägliche sMPS-Gesamtausscheidung zwischen 5 und 25 mg. Der größte Teil dieser Gesamtmenge besteht aus Ch-4-S und Ch-6-S. Der Rest setzt sich zusammen aus HS, DS, KS und HYS (LINKER and TERRY 1963, BERENSON and DALFERES 1965, SPRANGER et al. 1967, VARADI et al. 1967, SAITO et al. 1968, CHAKRAPANI and BACHHAWAT 1969, MURATA et al. 1970, TELLER und KRÜGER 1970).

Anders verhält es sich bei den Patienten, die an einer angeborenen Störung des Mucopolysaccharidstoffwechsels leiden, an einer der Mucopolysaccharidosen. Bei diesen Erkrankungen wird eine erhöhte Ausscheidung und ein verändertes Ausscheidungsmuster von sMPS gefunden (erstmal nachgewiesen von DORFMAN and LORINCZ 1957). Die erhöhte sMPS-Ausscheidung resultiert aus einem gestörten Abbau von sMPS in Fibroblasten (FRATANTONI et al. 1968).

Bislang konnten mit klinischen, radiologischen, zytologischen und biochemischen Methoden sechs Typen von Mucopolysaccharidosen differenziert werden, die in Tabelle 2 aufgeführt werden (Übersicht bei SPRANGER 1972).

Mit Hilfe biochemischer Methoden können qualitativ und quantitativ einzelne sMPS im Harn differenziert werden. Das Ausscheidungsmuster liefert einen wichtigen Hinweis auf die Diagnose, da jede Mucopolysaccharidose ein eigenes spe-

| Typ | Synonym             | Enzymdefekt                                             |
|-----|---------------------|---------------------------------------------------------|
| I-H | M. Pfaundler-Hurler | $\alpha$ -L-Iduronidase                                 |
| I-S | M. Scheie           | $\alpha$ -L-Iduronidase                                 |
| II  | M. Hunter           | Sulfoiduronat-Sulfatase                                 |
| III | M. Sanfilippo       | A) Heparin-Sulfamidase<br>B) $\beta$ -D-Glucosaminidase |
| IV  | M. Morquio          | ?                                                       |
| VI  | M. Maroteaux        | A) Galactosamin-4-Sulfat-Sulfatase<br>B) ?              |

Tab.2: Systematik der Muconolysaccharidosen.

zifisches Ausscheidungsmuster hat (Übersicht bei SPRANGER 1972). Leider hat eine genaue Diagnose für die Therapie noch keine Bedeutung. Es kann aber eine Aussage über die Prognose gemacht werden und vor allem eine genetische Beratung der Angehörigen durchgeführt werden.

In dieser Arbeit sollen neue Methoden der biochemischen Diagnostik auf ihre Brauchbarkeit untersucht und bei Patienten mit Muconolysaccharidosen durch Vergleich mit bekannten analytischen Methoden geprüft werden. Mit Hilfe der neuen Methoden werden Normwerte der Gesamt-sMPS-Ausscheidung und der Dermatanulfatausscheidung in den verschiedenen Abschnitten des Kindesalters aufgestellt.

## II. MATERIAL und METHODIK

### A) Untersuchter Personenkreis

Es wurden die Urine von 211 Kindern verschiedenen Alters untersucht. Das Material wurde der Universitätskinderklinik Kiel von verschiedenen Kliniken Deutschlands und des deutschsprachigen Auslandes zur Untersuchung zugesandt. Bei sämtlichen Kindern ist von den behandelnden Ärzten der Verdacht auf eine Mucopolysaccharidose ausgesprochen worden. Nach Durchführung aller notwendigen Laboruntersuchungen mußte bei 11% der Patienten die Verdachtsdiagnose bestätigt werden.

Verwendet wurden 24-Stunden Sammelurine, die zur Konservierung mit Toluol bzw. Thymollösung versetzt waren. Vor der Bearbeitung wurden ca. 10 ml Urin zur Bestimmung des Kreatininwertes nach LANGLEY and EVANS 1936 in der Modifikation für Autoanalyser entnommen. Der Kreatininwert bildet die Bezugsgröße zur quantitativen sMPS-Ausscheidung (SPRANGER und WIEDEMANN 1966, DI FERRANTE and LIPSCOMB 1970).

### B) Halbquantitative Suchtests auf sMPS

Zunächst wurde jeder Urin mit einem von BERRY 1959 und BERRY and SPINANGER 1960, in der Modifikation von SPRANGER und v. GERMAR 1967 angegebenen halbquantitativen Suchtest überprüft. 50 ausgewählte Urine wurden zusätzlich zum Vergleich mit einem halbquantitativen Suchtest nach BERMAN et al. 1971

untersucht. Mit dem Vergleich war die Wertigkeit eines kommerziell\* neu eingeführten Teststreifens zu prüfen.

#### 1) BERRY-Test

Es wird mit einer Pipette ein Tropfen Urin auf einen Filterpapierstreifen gegeben. Der Tropfen sollte den Durchmesser von 1 cm nicht überschreiten. Anschließend wird der Filterpapierstreifen unter Föhnstrom getrocknet und dann für 45 Sekunden in eine Toluidinblau-Lösung gelegt. Er wird dann für 6 Minuten in mehrfach gewechselter 10% Essigsäure entfärbt.

Der Test ist positiv, wenn nach Lufttrocknung ein blauer Fleck sichtbar bleibt.

Reagenzien: a) Toluidinblau-Lösung

0,5 g Toluidinblau in 200 ml Aceton  
und 50 ml aqua dest. lösen

b) 10% Essigsäure

c) Filterpapier WHATMAN no 4, 10" x 10"

#### 2) MPS-Papers-Schnelltest\*

Es wird ein Tropfen Urin auf den Teststreifen pipettiert. Nach drei Minuten wird der Streifen für 10 Minuten in eine Waschlösung gelegt. Die Lösung sollte mehrfach während des Waschvorganges gewechselt werden.

Der Test ist positiv, wenn nach Lufttrocknung ein blauer Fleck sichtbar bleibt.

Reagenzien: Waschlösung, zusammengesetzt aus

\* Firma Ames

0,1 ml Eisessig  
+20 ml Methanol zur Analyse  
+ 200 ml aqua destillata.

### C) Fällung und Reinigung der sMPS

Urin-sMPS wurden ausgefällt mit der Cetavlon-Methode nach DI FERRANTE and RICH 1956. 25 ml Urin werden mit 1n HCl bzw. 1n NaOH auf pH 5 eingestellt. Danach wird 1 ml einer 5% Trimethylammoniumbromidlösung hinzugegeben. Das Gemisch bleibt 24 Stunden bei 4°C stehen und wird dann bei 3000 U/min 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das Präzipitat wird drei mal in 96% NaCl-gesättigtem Äthanol aufgewirbelt. Nach jedem Waschvorgang wird 10 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Präzipitat wird dann in 10 ml 0,05 n NaOH aufgenommen und homogenisiert.

Reagenzien: a) 5 g Trimethylammoniumbromid

+ 95 ml aqua dest.

b) NaCl in 96% Äthanol, gesättigte Lösung

c) 0,05 n NaOH

d) 1 n HCl

e) 1 n NaOH

### D) Nachweis der Hexuronsäure

Die Hexuronsäure wurde quantitativ mit der "one step carbazole

reaction" nach SAJDERA 1972 gemessen. Zu 0,5 ml der Probe (Vorbereitung s.o.) werden 0,2 ml einer 0,2% Carbazollösung und 5 ml eines  $H_2SO_4$ -Borat-Gemisches hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wird anschließend für 15 Minuten auf  $100^{\circ}C$  im Glycerinbad erhitzt. Es entwickelt sich proportional zur vorhandenen Menge Hexuronsäure eine mehr oder weniger intensive rote Farbe. Die Reaktion beruht auf folgendem Prinzip, das DISCHE erstmals 1929 anwandte: wenn Zucker mit starken wasserlöslichen Säuren vermischt werden, bilden sich Reaktionsprodukte, die mit verschiedenen organischen Substanzen (z.B. Indol, Diphenylamin, Carbazol) Farbreaktionen eingehen. Nach Kühlung in Eiswasser wird die Extinktion mit dem Photometer bei einer Wellenlänge von 530 nm gemessen.

Die Berechnung erfolgt nach folgender Formel:

$$\frac{E_{\text{Probe}} \times 40 \times 10}{E_{\text{Standard}}} = X \% : 1000 = \text{Hexuronsäure in mg\%}$$

Reagenzien: a) 0,2% Carbazollösung

0,2 g Carbazollösung in 100 ml abs. Äthanol

b)  $H_2SO_4$ -Borat-Gemisch

9,5 g Borat in 200 ml aqua dest. lösen,  
von dieser Lösung 50 ml mit 950 ml konz.  
 $H_2SO_4$  vermischen.

#### E) Nachweis des Dermatansulfates

Dermatansulfat wurde quantitativ mit einer Methode von DI FERRANTE et al. 1971 nachgewiesen. Zu 0,5 ml der Probe (Vorbereitung s.o.) werden 0,1 ml 1n  $H_2SO_4$  und 0,2 ml eines Gemi-

ches, bestehend aus 0,1 M Natrium-Perjodat und 0,2 M Natrium-Perchlorat, hinzugefügt. Das Reagenzgemisch wird homogenisiert und dann eine Stunde lang bei 37°C inkubiert. Nach Entfernung aus dem Wasserbad werden 0,3 ml einer 3%  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ -Lösung hinzugegeben. Das Gemisch wird so lange geschüttelt, bis die entstehende braune Farbe wieder verschwunden ist. Dann wird 0,5 ml Schiffssches Reagenz dazugegeben. Nach der Mischung wird die Lösung noch für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Es entwickelt sich eine rote Farbe, deren Intensität von der Dermatansulfatkonzentration in der Probe abhängt. Der Reaktionsmechanismus ist der gleiche wie in der Carbazol-Reaktion. Das Reaktionsprodukt aus Iduronsäure und Schwefelsäure geht mit dem organischen Indikator "Schiffssches Reagenz" eine Farb-reaktion ein. Da L-Iduronsäure leichter und schneller mit diesen Substanzen reagiert als D-Glucuronsäure, wird vorzugsweise L-Iduronsäure mit dieser Methode nachgewiesen. Nach Abkühlung wird die Extinktion bei einer Wellenlänge von 540 nm mit dem Photometer gemessen.

Die Berechnung erfolgt nach folgender Formel:

$$\frac{E_{\text{Probe}}}{E_{\text{Standard}}} \times 60 \times 80 = \gamma \% : 1000 = \text{mg\% Dermatansulfat}$$

Reagenzien: a) 1n  $\text{H}_2\text{SO}_4$

b) 0,1 M  $\text{NaJO}_4$  - 2,14 g  
 0,2 M  $\text{NaClO}_4$  - 2,80 g } in 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$

c) 3%  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$

d) Schiffssches Reagenz

1,0 g Fuchsin }  
 1,9 g  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  } in 100 ml 0,15 n HCl

## F) Weiterverarbeitung positiver Tests

Bei Vorliegen eines positiven Ergebnisses im grobquantitativen Suchtest nach BERRY und einer erhöhten Ausscheidung sMPS, nachgewiesen durch die Carbazol-Reaktion der gefällten sMPS, wurden die sMPS qualitativ getrennt mit Hilfe einer fraktionierten Säulenchromatographie. Dabei wird eine vorbereitete Probe auf eine Dowex 1X 2 Kunstharzsäule aufgetragen. Die qualitative Trennung der sMPS beruht auf der Absorption und nachfolgenden Elution mit steigenden Kochsalzgradienten (DAVIDSON and MEYER 1954, SCHILLER et al. 1961, TELLER und ZIE-MANN 1966, SPRANGER et al. 1967). Die eluierten sMPS werden in 5 ml Portionen durch die Carbazol-Reaktion nachgewiesen. Aus der mengenmäßigen Verteilung der sMPS auf die einzelnen Fraktionen lassen sich empirische Rückschlüsse auf die vorliegende Mucopolysaccharidose ziehen (SPRANGER 1971).

Zur genauen Identifizierung der sMPS in den einzelnen Fraktionen wurde eine Celluloseacetat-Mikroelektrophorese durchgeführt (MANLEY and HAWSKWORTH 1966, HERD 1967, ONISAWA and LEE 1970). Die mit 0,5 M, 1,25 M, 1,5 M, 2,0 M NaCl-Lösung eluierten sMPS wurden gepoolt und 24 Stunden gegen fließendes Wasser dialysiert, eingeeengt und mikroelektrophoretisch auf Celluloseacetat (modifiziert nach HERD 1967) getrennt.

Laufmittel: 0,1 M Bariumacetat-Puffer, pH 8,0

Laufzeit: 45 Minuten bei 160 Volt

Die Anfärbung der Proben erfolgte mit 1% Alcienblau in 5% Essigsäure. Nach 2 Minuten wurde entfärbt in 5% Essigsäure. Als Vergleichssubstanzen dienten reine Lösungen mit Chondroitinsulfat, Dermatan-sulfat und Heparansulfat.

### III. E R G E B N I S S E

#### A) Vergleich des BERRY-Testes mit dem MPS-Papers-Schnelltest

In einem Vorversuch wurden Testlösungen hergestellt, die jeweils 20 mg% Chondroitinsulfat, Dermatansulfat oder Heparansulfat enthielten. Diese Lösungen wurden sowohl mit dem BERRY-Test, als auch mit dem MPS-Papers-Schnelltest überprüft. Die Blaufärbung der sMPS auf den Papierstreifen war beim BERRY-Test wie beim MPS-Papers-Schnelltest erheblich und bei allen drei Testlösungen gleich. Der blaue Fleck bei dem BERRY-Test behielt den gleichen Umfang auf dem Teststreifen wie der ursprünglich pipettierte Tropfen, während der blaue Fleck auf dem MPS-Papers-Teststreifen gegenüber der ursprünglichen Grösse deutlich geschrumpft erschien. Außerdem wies der blaue Fleck bei dem BERRY-Test im Gegensatz zum MPS-Papers-Schnelltest einen deutlich dunkelblau-violetten Randsaum auf.

In einem zweiten Vorversuch wurde der Urin eines dreijährigen Kindes untersucht, der mit 22,8 mg Hexuronsäure/g Kreatinin altersgemäße Muconopolysaccharidmengen enthielt. Zu jeweils 25 ml dieses Urines wurden immer größere Mengen einer 250 mg% Chondroitinsulfatlösung gegeben. Es zeigte sich, daß der BERRY-Test bei einem quantitativem Gehalt des mit sMPS angereicherten Urines entsprechend 28,6 mg Hexuronsäure/g Kreatinin fraglich positiv reagierte. Der nächst höhere Wert von 32,9 mg Hexuronsäure/g Kreatinin erwies sich im BERRY-Test als eindeutig positiv.

Die obere Grenze des altersgemäß normalen sMPS-Gehaltes liegt bei 30 mg Hexuronsäure/g Kreatinin.

Der MPS-Paners-Schnelltest zeigte dagegen erst ein fraglich positives Ergebnis bei einem Wert von 47,9 mg Hexuronsäure/g Kreatinin (s. Tab.3).

|                    | mg% Hexurons. | mg Hex./g Kr. | BERRY-T.  | MPS-P.    |
|--------------------|---------------|---------------|-----------|-----------|
| • Urin ohne Zusatz | 1,28          | 22,8          | -         | -         |
| u + 0,1 ml *       | 1,37          | 24,4          | -         | -         |
| u + 0,2 ml *       | 1,54          | 27,6          | -         | -         |
| u + 0,3 ml *       | 1,6           | 28,6          | (+)       | -         |
| * * - - - - -      | - - - - -     | - - - - -     | - - - - - | - - - - - |
| u + 0,4 ml *       | 1,84          | 32,9          | +         | -         |
| u + 0,5 ml *       | 2,29          | 40,9          | +         | -         |
| u + 0,6 ml *       | 2,34          | 41,8          | +         | -         |
| u + 0,8 ml *       | 2,68          | 47,9          | +         | (+)       |
| u + 1,0 ml *       | 2,98          | 53,2          | +         | (+)       |
| u + 2,0 ml *       | 4,40          | 78,5          | +         | +         |

Tab.3: Vergleich des BERRY-Testes mit dem MPS-Paners-Schnelltest.

\* einer 250 mg% Chondroitinsulfatlösung

\* \* oberste Normgrenze

Es wurden dann 50 ausgewählte Urine von Kindern verschiedenen Alters mit beiden Testverfahren untersucht. Beide Suchtests zeigten dabei annähernd die gleichen Ergebnisse. In jedem Fall reagierten beide Tests eindeutig positiv bei Urinen von Kindern

mit nachgewiesener Mucopolysaccharidose. Falsch negative Ergebnisse wurden nicht beobachtet. Allerdings kam kein Urin zur vergleichenden Untersuchung, dessen sMPS-Gehalt gerade über dem Normbereich lag. Es handelte sich bei den Urinen mit pathologischem Ergebnis ausnahmslos um Urine mit einem erheblich erhöhten sMPS-Gehalt. Bei den Urinen, deren sMPS-Gehalt in der Norm lag, zeigten beide Streifentests negative Ergebnisse. Gelegentlich aber fiel der BERRY-Test bei Urinen mit hohen Kreatininwerten fraglich positiv aus.

#### B) Hexuronsäureausscheidung

Die Hexuronsäureausscheidung sinkt in Bezug auf die Kreatininausscheidung asymptotisch ab (s. Abb. 1). Die abnehmende Tendenz kann für das vorliegende Material durch Angabe der Mediane und des 95% Vertrauensbereiches in den einzelnen Altersstufen gezeigt werden (s. Tab. 4). Die sMPS-Ausscheidung ist geschlechtsunabhängig.

\*Die statistische Beratung erfolgte dankenswerterweise durch Frau Diplom-Volkswirtin Burrey vom Institut für Medizinische Statistik und Dokumentation der Universität Kiel.

| Alter     | Anzahl | Median $\bar{x}$ | 95% VB    | Grenzwerte<br>min. max. |
|-----------|--------|------------------|-----------|-------------------------|
| 0-1M.     | 9      | 50,4             | 14,2-61,0 | 11,5-121,1              |
| 2M.-3M.   | 21     | 44,6             | 38,1-59,0 | 11,0-96,5               |
| 4M.-6M.   | 18     | 35,0             | 27,6-42,5 | 14,0-69,3               |
| 7M.-1J.   | 16     | 33,6             | 19,8-36,9 | 13,4-45,2               |
| 1J.-3J.   | 31     | 21,6             | 16,1-26,0 | 13,0-43,4               |
| 3J.-5J.   | 32     | 18,9             | 15,4-25,6 | 12,4-42,8               |
| 5J.-10J.  | 34     | 14,4             | 11,8-18,3 | 6,05-34,8               |
| 10J.-15J. | 27     | 13,0             | 9,6-14,8  | 5,2-23,2                |

Tab.4: Die Mediane und 95% Vertrauensbereiche der Hexuronsäureausscheidung in den verschiedenen Altersstufen des Kindesalters (ermittelt nach SACHS 1974). Es kamen nur Urine von Kindern zur Auswertung, bei denen eine Mucopolysaccharidose ausgeschlossen werden konnte.

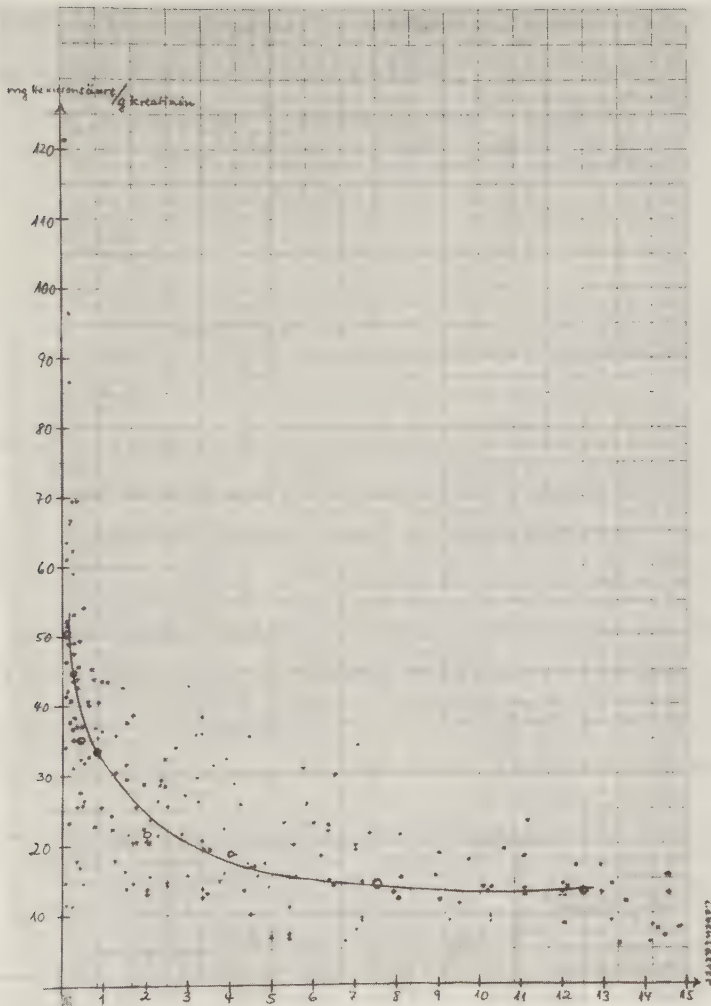


Abb.1: Legende auf S. 18

Abb.1: Graphische Darstellung der Hexuronsäureausscheidung/

Kreatininausscheidung in Bezug auf das Lebensalter.

Die Mediane der einzelnen Altersstufen sind dargestellt und durch Linie verbunden. Es zeigt sich ein asymptotischer Verlauf. Sämtliche Hexuronsäurewerte von Kindern mit normaler sMPS-Ausscheidung, die in dieser Arbeit verwertet wurden, sind dargestellt.

• = Mediane

C) Dermatansulfatausscheidung

Auch die Dermatansulfatausscheidung sinkt bezogen auf die Kreatininausscheidung asymptotisch ab. Die abnehmende Tendenz zeigt sich durch Angabe der Mediane und des 95% Vertrauensbereiches in den einzelnen Altersstufen (s. Abb.2 und Tab.6). Die Methode von DI FERRANTE erwies sich als sehr spezifisch für Dermatansulfat. Andere sMPS zeigten nur geringe Reaktionen bei Durchführung dieser Methode. Die Wiedergewinnung bekannter Mengen Dermatansulfats war mit 96-100% sehr gut (s.Tab.5).

| Dermatansulfat<br>(20 mg% Lösung) |        | Chondroitinsulfat<br>(20 mg% Lösung) |       | Heparansulfat<br>(20 mg% Lösung) |       |
|-----------------------------------|--------|--------------------------------------|-------|----------------------------------|-------|
| Extinktion                        | %      | Extinktion                           | %     | Extinktion                       | %     |
| 900                               | = 100  | 5                                    | = 0,5 | 50                               | = 5,5 |
| 890                               | = 98,8 | 6                                    | = 0,6 | 50                               | = 5,5 |
| 890                               | = 98,8 | 5                                    | = 0,5 | 50                               | = 5,5 |
| 870                               | = 96,4 |                                      |       |                                  |       |
| 890                               | = 98,8 |                                      |       |                                  |       |

Tab.5: Legende auf S.19

Legende zu Tab.5: Wiedergewinnung bekannter Mengen an Dermatensulfat, Chondroitinsulfat und Heparansulfat mit der Dermatensulfatnachweismethode nach DI FERRANTE 1971.

Es ist die Wiedergewinnung in Prozenten der in den Ansatz gegebenen Mengen an SMPS angegeben.

| Alter      | Anzahl | Median $\bar{x}$ | 95% VB     | Grenzwerte<br>min. max. |
|------------|--------|------------------|------------|-------------------------|
| 0-1M.      | 7      | 101,0            | 26,2-208,0 | 25,2-247,0              |
| 2M.-3M.    | 7      | 79,4             | 22,2-134,0 | 22,2-176,0              |
| 4M.-6M.    | 18     | 44,8             | 26,0-62,8  | 15,4-86,9               |
| 7M.-<1J.   | 16     | 39,1             | 21,8-56,2  | 13,4-82,8               |
| 1J.-<3J.   | 30     | 35,0             | 20,0-41,7  | 11,7-64,2               |
| 3J.-<5J.   | 32     | 31,2             | 19,4-38,6  | 9,7-63,5                |
| 5J.-<10J.  | 27     | 18,6             | 12,0-33,0  | 8,0-61,0                |
| 10J.-<15J. | 24     | 16,3             | 11,6-24,2  | 5,5-42,2                |

Tab.6: Die Mediane und 95% Vertrauensbereiche des Dermatensulfates in den verschiedenen Altersstufen. Es kamen nur Urine von Kindern zur Auswertung, bei denen eine Mucopolysaccharidose ausgeschlossen werden konnte.

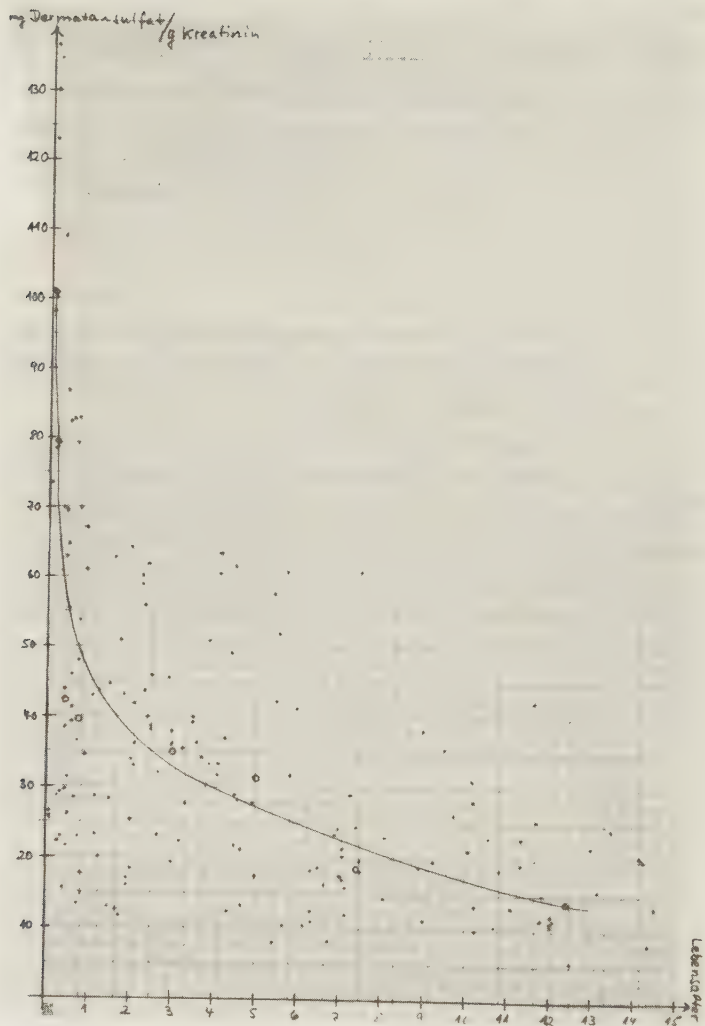


Abb.2: Legende auf S.21

Abb.2: Graphische Darstellung der Dermatansulfatausscheidung/  
Kreatininausscheidung in Bezug auf das Lebensalter.  
Die Mediane der einzelnen Altersstufen sind durch Linie  
verbunden. Es zeigte sich ein asymptotischer Verlauf.  
Sämtliche Dermatansulfatwerte von Kindern mit normaler  
Dermatansulfatausscheidung, die in dieser Arbeit ver-  
wertet wurden, sind dargestellt.  
● = Mediane

#### D) Pathologische Befunde

Es wurden 23 Urine von Patienten mit Mucopolysaccharidosen  
untersucht. Im einzelnen handelte es sich um zwei Kinder mit  
einem M. Pfaundler-Hurler (Typ I-H), zwei mit einem Spät Hurler  
Syndrom (I-S), sechs mit einem M. Hunter (II), elf mit einem  
M. Sanfilippo (III), einen Jungen mit einem M. Morquio (IV)  
und schließlich um ein Mädchen mit einem Hurler-Scheie compound  
(I-H-S). (s.Tab.7).

| Diagnose                 | Person | Alter     | mg Hex./<br>g Kr. | 95% VB<br>(Hex.) | mg DS/<br>g Kr. | 95% VB<br>(DS) |
|--------------------------|--------|-----------|-------------------|------------------|-----------------|----------------|
| I-H Pfaundler-<br>Hurler | M.V.   | 3J., 2M.  | 96,0              | 15,4-25,6        | 142,0           | 19,4-38,6      |
|                          | A.T.   | 5J., 2M.  | 66,7              | 11,8-18,3        | 91,0            | 12,0-33,0      |
| I-S Spät<br>Hurler       | W.B.   | 11J., 6M. | 45,9              | 9,6-14,8         | 40,0            | 11,6-24,2      |
|                          | H.V.   | 16J., 5M. | 26,1              |                  | 15,4            |                |

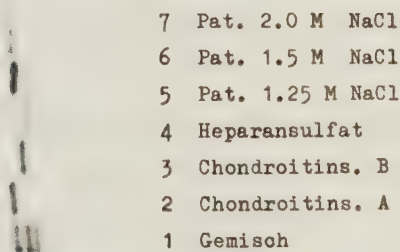
| Diagnose                      | Person | Alter     | mg Hex./<br>g Kr. | 95% VB<br>(Hex.) | mg DS/<br>g Kr. | 95% VB<br>(DS) |
|-------------------------------|--------|-----------|-------------------|------------------|-----------------|----------------|
| I-H-S Hurler-<br>Scheie comp. | A.P.   | 14J., 8M. | 66,0              | 9,6-14,8         | 165,0           | 11,6-24,2      |
| II Hunter                     | A.L.   | 1J., 10M. | 156,0             | 16,1-26,0        | 440,0           | 20,0-41,7      |
|                               | M.R.   | 3J., 4M.  | 89,5              | 15,4-25,6        | 157,0           | 19,4-38,6      |
|                               | M.M.   | 4J., 2M.  | 46,1              | 15,4-25,6        | 141,0           | 19,4-38,6      |
|                               | M.K.   | 4J., 11M. | 160,5             | 15,4-25,6        | 276,0           | 19,4-38,6      |
|                               | F.M.   | 6J., 0J.  | 100,05            | 11,8-18,3        | 255,0           | 12,0-33,0      |
|                               | K.K.   | 9J., 4M.  | 56,9              | 11,8-18,3        | 116,0           | 12,0-33,0      |
| III Sanfilippo                | K.G.   | 8M.       | 87,0              | 19,8-36,9        | 48,0            | 21,8-56,2      |
|                               | B.N.   | 1J., 8M.  | 82,0              | 16,1-26,0        | 11,6            | 20,0-41,7      |
|                               | F.G.   | 3J., 0J.  | 79,0              | 15,4-25,6        | 41,8            | 19,4-38,6      |
|                               | M.K.   | 3J., 2M.  | 50,2              | 15,4-25,6        | 26,2            | 19,4-38,6      |
|                               | J.K.   | 4J., 1M.  | 57,8              | 15,4-25,6        | 75,0            | 19,4-38,6      |
|                               | V.B.   | 4J., 8M.  | 125,0             | 15,4-25,6        | 40,9            | 19,4-38,6      |
|                               | R.W.   | 6J., 6M.  | 95,0              | 11,8-18,3        | 39,2            | 12,0-33,0      |
|                               | P.G.   | 11J., 2M. | 88,6              | 9,6-14,8         | 36,8            | 11,6-24,2      |
|                               | W.E.   | 14J., 6M. | 68,6              | 9,6-14,8         | 37,8            | 11,6-24,2      |
|                               | J.L.   | 19J., 6M. | 8,99              |                  | 1,58            |                |
|                               | A.W.   | 3J., 10M. | 138,0             | 15,4-25,6        | 49,0            | 19,4-38,6      |
| IV Morquio                    | F.V.   | 16J., 3M. | 25,2              |                  | 13,0            |                |

Tab.7: Darstellung der Hexuronsäure- und der Dermatanulfatausscheidung in Bezug auf den Kreatininwert aller beobachteten Fälle von Mucopolysaccharidose. Zum Vergleich sind die 95% Vertrauensbereiche der entsprechenden Altersstufen angegeben.

Die Verdachtsdiagnosen, die aufgrund des klinischen, radiologischen Bildes gestellt und in einzelnen Fällen durch Enzymbestimmung in gezüchteten Fibroblasten verifiziert wurden, konnten mit Hilfe der oben beschriebenen differenzierenden biochemischen Methoden bestätigt und spezifiziert werden. Es gelang in allen Fällen, eine genaue Diagnose zu stellen. Der grob quantitative Suchtest nach BERRY gab den ersten Hinweis auf eine Mucopolysaccharidose. Durch direkte Bestimmung der Hexuronsäure mit der "one step carbazole reaction" nach SAJDERA 1972 wurde eine Bestätigung des Verdachts einer Mucopolysaccharidose mit erhöhter Mucopolysaccharidurie gesucht. Mit Hilfe der fraktionierten Säulenchromatographie und der Mikroelektrophorese wurden die s'PS dann qualitativ getrennt. Zusätzlich wurde bei allen Urinen das Dermatansulfat nach DI FERRANTE 1971 bestimmt. Es ergaben sich folgende Ergebnisse:

- 1.) Die Direktbestimmung der Hexuronsäure ergab bei allen Personen mit Mucopolysaccharidosen eindeutig pathologische Werte (s. Tab.7).
- 2.) Die Direktbestimmung des Dermatansulfates ergab pathologische Werte bei den Mucopolysaccharidosetypen, bei denen es zu erwarten war (s. Tab.7). Auffallend ist die excessiv hohe Dermatansulfaturie bei einigen Kindern mit M.Hunter. Bis auf drei weisen alle Kinder mit M. Sanfilippo eine pathologische Dermatansulfatausscheidung auf. Die Patienten mit Spät Hurler Syndrom zeigten eine normale Dermatansulfatexcretion. Bei dem Mädchen mit Hurler-Scheie compound war sowohl die Hexuronsäure-, als auch die Dermatansulfatausscheidung deutlich erhöht.

3.) Mit Hilfe der Mikroelektrophorese konnten frühere Untersuchungen von MARTEAUX et al. 1963, KIRK et al. 1964, TELLER und ZIEMANN 1966, SPRANGER et al. 1967 bestätigt werden, wonach bei der Säulenchromatographie mit Dowex 1x2 in der 1,25 M NaCl-Fraktion vorwiegend Heparansulfat, in der 1,5 M NaCl-Fraktion vorwiegend Chondroitin-4-Sulfat und Chondroitin-6-Sulfat, in der 2,0 M NaCl-Fraktion vor allem Dermatan-sulfat erscheint. Im Gegensatz zu früheren Annahmen zeigte sich jedoch, daß in der 1,25 M NaCl-Fraktion Substanzen mit einer Wanderungsgeschwindigkeit von Chondroitin-4-Sulfat, in der 1,5 M NaCl-Fraktion auch Urin-sMPS mit einer Wanderungsgeschwindigkeit wie Dermatan-sulfat und in der 2,0 M NaCl-Fraktion auch Urin-sMPS mit einer Wanderungsgeschwindigkeit wie Referenz-Chondroitin-4-(-6)-Sulfat erscheinen (s. Abb.3,4,5).



**Abb.3:** Mikroelektrophorese der gepoolten, dialysierten und eingeeengten Fraktionen eines gesunden Kindes.

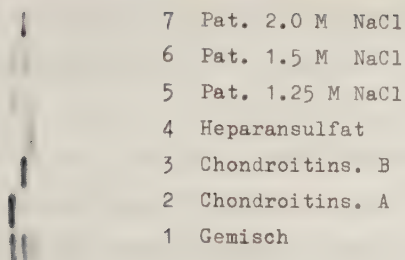


Abb.4: Mikroelektrophorese der gepoolten, dialysierten und eingeeengten Fraktionen eines Kindes mit M.Hunter. Gute Darstellung des DS in der 2,0 M NaCl-Fraktion. HS in der 1,25 M NaCl-Fraktion.

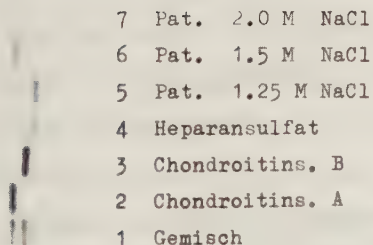


Abb.5: Mikroelektrophorese der gepoolten, dialysierten und eingeeengten Fraktionen eines Kindes mit M. Sanfilippo. Gute Darstellung des Heparansulfates in der 1,25 M NaCl-Fraktion.

#### IV. DISKUSSION

##### A) Grobquantitative Suchtests

In dieser Arbeit wurden zwei grobquantitative Suchtests auf Urin-Mucopolysaccharide miteinander verglichen. Es zeigte sich, daß der kommerziell eingeführte MPS-Papers-Schnelltest nicht empfindlich genug ist. Wie aus der Tabelle 3 ersichtlich, zeigte er bei Testung eines Urines mit eindeutig pathologischem sMPS-Gehalt ein negatives Ergebnis. Ein drei jähriges Kind dürfte nicht über 30 mg sMPS-Hexuronsäure/g Kreatinin ausscheiden. Der MPS-Papers-Schnelltest brachte jedoch erst bei 47,9 mg Hexuronsäure/g Kreatinin ein fraglich positives Ergebnis. Der BERRY-Test reagierte dagegen schon bei 28,6 mg Hexuronsäure/g Kreatinin fraglich positiv und war bei einem quantitativen Gehalt von 32,9 mg Hexuronsäure/g Kreatinin eindeutig positiv. Damit erwies sich der BERRY-Test als sehr zuverlässig. Der BERRY-Test ist genau so einfach und eher schneller durchführbar als der MPS-Papers-Schnelltest. Außerdem ist er bedeutend billiger als der MPS-Papers-Schnelltest.

REZVANI et al. 1973 verglichen den MPS-Papers-Schnelltest mit zwei anderen Schnelltests auf sMPS. Ganz im Gegensatz zu uns fanden sie in 34% der untersuchten Fälle falsch positive Ergebnisse mit dem MPS-Papers-Schnelltest. Wir konnten mit diesem Test kein falsch positives Ergebnis erzielen, beobachteten dagegen falsch negative Ergebnisse. REZVANI et al. fanden schon

bei 20  $\gamma$  Hexuronsäure/ml Urin ein positives Ergebnis, während bei unseren Untersuchungen der Test erst bei 26,8  $\gamma$  Hexuronsäure/ml Urin fraglich positiv ausfiel. Zum quantitativen Nachweis der sMPS benutzten REZVANI et al. die Carbazol-Methode nach DISCHE, während wir mit der Modifikation dieser Methode nach SAJDERA arbeiteten. Hierin dürfte aber nach unseren Untersuchungen nicht die Ursache der Differenz liegen. Beide Methoden waren von uns vergleichend untersucht worden. Die Ergebnisse unterschieden sich nicht voneinander. Unerklärlich blieb uns auch, daß einige der uns zugesandten Urine in den aussendenden Kliniken mit dem MPS-Paoers-Schnelltest untersucht worden waren und dort ein positives Ergebnis gebracht hatten. Eine Überprüfung bei uns mit beiden Schnelltests und den genauen quantitativen Nachweisverfahren brachte in allen diesen Fällen eindeutig negative Ergebnisse.

#### B) Hexuronsäureausscheidung

Weiter wurde die Ausscheidung der Gesamtmucopolysaccharide anhand ihres Hexuronsäuregehaltes und die Dermatan-sulfatausscheidung im Urin in Bezug auf den Kreatininwert untersucht. Es wurden zwei neue Methoden angewandt, die bislang in den Routinebetrieb noch nicht eingeführt waren und mit denen daher noch keine ausreichenden Erfahrungen gemacht werden konnten. Es zeigte sich, daß die auf Kreatinin bezogene Ausscheidung sowohl der Gesamt-Mucopolysaccharide, als auch von Dermatan-

sulfat mit zunehmendem Alter asymptotisch abfällt. Dies entspricht früheren Befunden von SPRANGER und WIEDEMANN 1966. RICH et al. 1957, TELLER et al. 1962 und LAGUNOFF et al. 1967 hatten eine lineare Abnahme des sMPS-Kreatinin Quotienten gefunden. Im Gegensatz zu uns hatten die drei Autorengruppen jedoch keine bzw. nur wenige Säuglingsurine untersucht. Da der Kreatininwert von der absoluten Muskelmasse des Individuums abhängt, ist verständlich, daß bei der relativ geringen Muskelmasse und Kreatininurie des Säuglings der sMPS-Kreatinin Quotient in den ersten Lebensmonaten sehr hoch liegt. Die Kreatininausscheidung als Bezugsgröße zur sMPS-Ausscheidung zu benutzen, erweist sich als vorteilhaft (DI FERRANTE and LIPCOMP 1970). Bei Personen mit Nieren- oder Muskelerkrankungen ist der Kreatininwert jedoch nicht verwertbar.

In Übereinstimmung mit TELLER et al. 1962, SPRANGER und WIEDEMANN 1966 und DOUGLAS et al. 1973 fanden wir keinen Geschlechtsunterschied der sMPS-Ausscheidung im Kindesalter. RICH et al. 1957 stellten eine höhere sMPS-Ausscheidung bei Jungen fest. In verschiedenen älteren Arbeiten wird von einer erhöhten sMPS-Ausscheidung bei Männern berichtet (KERBY 1954, CRADDOCK et al. 1955, RECHENBERGER 1960). Die unterschiedlichen Untersuchungsergebnisse beruhen wahrscheinlich auf der vermehrten Körpermasse der Männer. Diese Variable wird beim Bezug der sMPS-Ausscheidung auf Kreatinin ausgeschaltet.

Normalwerte der sMPS-Ausscheidung im Kindesalter sind veröffentlicht worden (RICH et al. 1957, TELLER et al. 1962, MAYES and HANSEN 1966, SPRANGER et al. 1967, LAGUNOFF et al.

1967, TELLER und KRÜGER 1970, DOUGLAS et al. 1973). Alle Autorengruppen ermittelten den Hexuronsäuregehalt mit der Carbazol-Methode von DISCHE 1947 oder einer Modifikation dieser Methode nach BITTER et al. 1962. In vergleichenden Untersuchungen fanden wir, wie schon erwähnt, keine Differenzen in den Ergebnissen dieser "two step carbazole reaction" mit der von uns benutzten einfacheren und schnelleren "one step carbazole reaction" nach SAJDERA 1972. Dementsprechend liegen unsere Ergebnisse etwa in den gleichen Grenzen. Gegenüber allen anderen Autorengruppen haben wir mehr Urine untersucht, so auch mehr Säuglingsurine. In den ersten Lebenstagen schwankt die sMPS-Ausscheidung in Bezug auf den Kreatininwert ganz erheblich, so daß es schwer fällt, in diesem Lebensalter einen normalen von einem pathologischen Wert zu differenzieren.

### C) Dermatansulfatausscheidung

Normalwerte der Dermatansulfatausscheidung sind bislang noch nicht ermittelt worden. Es überrascht, daß entgegen bisheriger Vermutungen Dermatansulfat zu einem größeren Teil im menschlichen Urin vorhanden ist. Verschiedene Untersucher waren bei der qualitativen und quantitativen Darstellung der sMPS mit Hilfe der Säulenchromatographie über Dowex 1x2 zu unterschiedlichen Ergebnissen gekommen. BERENSON und DALFERES 1965, SPRANGER et al. 1967, TELLER und KRÜGER 1970 errechneten aus dem Anteil der Carbazol-positiven Substanzen in der säulenchroma-

tographischen Fraktion 2,0 M NaCl eine Dermatansulfatausscheidung bei gesunden Kindern zwischen 4 und 27%. VARADI et al. 1967 und ORII 1968 konnten dagegen nur zu etwa 1 - 2% Dermatansulfat in der Gesamtmenge der von ihnen untersuchten Urine nachweisen. Bei der Säulenchromatographie mit Dowex 1x2 erscheint das Dermatansulfat jedoch nicht nur in der 2,0 M NaCl-Fraktion (MAROTEAUX et al. 1963, KIRK et al. 1964, TELLER und ZIEMANN 1966, SPRANGER et al. 1967), sondern, wie unsere elektrophoretischen Untersuchungen zeigten, auch in der 1,5 M NaCl-Fraktion. Quantitativ werden die sLPS in den einzelnen Fraktionen mit der Carbazol-Methode nach DISCHE bestimmt. Infolge des Iduronsäuregehaltes des Dermatansulfates erhält man mit dieser Methode nur 61% des Uronsäurewertes (GREILING 1966). Da die Ergebnisse in den erwähnten Arbeiten die verminderte Reagibilität von Dermatansulfat mit Carbazol nicht in Rechnung stellten und außerdem den Dermatansulfatgehalt in der 1,5 M NaCl-Fraktion nicht berücksichtigten, erklärt sich so die Differenz zu unseren Ergebnissen.

#### D) Pathologische Befunde

Es wurden die Urine von 23 Kindern mit Muconolysaccharidosen sowohl mit den neuen, als auch mit schon länger eingeführten Analyseverfahren untersucht.

In vielen Arbeiten sind charakteristische Ausscheidungsmuster der einzelnen Muconolysaccharidosen (Übersicht bei SPRAN-

GER 1972) dargestellt worden.

TERRY and LINKER 1964, MANLEY and WILLIAMS 1969 und SPRANGER 1970 fanden, daß Patienten mit M. Pfaundler-Hurler (Typ I-H) relativ mehr Dermatan-sulfat und weniger Heparan-sulfat ausscheiden als Patienten mit M. Hunter (Typ II). Bei den wenigen Fällen, die wir untersucht haben, können wir noch kein abschließendes Urteil geben. Es fällt jedoch auf, daß die Dermatan-sulfatausscheidung in direkter Bestimmung bei den sechs von uns untersuchten Fällen von M. Hunter vergleichsweise hoch liegt. DI FERRANTE et al. 1971 haben fünf Fälle von M. Hunter mit den gleichen Methoden wie wir untersucht und konnten in drei Fällen mehr Iduronsäure als 2-Desoxy-2-Sulphaminohexose nachweisen. In den beiden übrigen Fällen verhielt es sich umgekehrt. Der direkte Nachweis der Sulphaminohexose mit der Methode von LAGUNOFF and WARREN 1962 gelang bei uns leider nicht befriedigend.

Verschiedene Untersucherguppen (TERRY et al. 1964, MAROTEAUX 1965, FALLIS et al. 1968, Mc. KUSICK 1972) berichteten über Patienten mit einem Spät Hurler Syndrom (Typ I-S), bei denen sie eine erhöhte Gesamt-SMPS-Ausscheidung feststellten. Zum größten Teil bestand sie aus Heparan-sulfat und Dermatan-sulfat. LANGER et al. 1966 und SPRANGER 1970 konnten bei diesem Mucopolysaccharidostyp keine erhöhte Gesamt-SMPS-Ausscheidung feststellen. SPRANGER fand jedoch eine erhöhte Dermatan-sulfaturie. Der eine unserer beiden Fälle mit Spät Hurler Syndrom wies eine mäßig erhöhte Gesamt-SMPS-Ausscheidung auf.

Der andere Patient blieb im Normbereich. Die Dermatansulfatausscheidung war beim ersten Fall erhöht, beim zweiten normal. In Übereinstimmung mit TERRY and LINKER 1964 und ONISAWA and LEE 1970 fanden wir, daß Patienten mit Spät Hurler Syndrom wesentlich geringere Mengen Dermatansulfat ausscheiden als Patienten mit M. Pfaundler-Hurler und M. Hunter.

Bei dem Hurler-Scheie compound (Typ I-H-S) handelt es sich um eine seltene Mucopolysaccharidose, die autosomal-rezessiv vererbt wird. Im Phänotyp vermischen sich die typischen Symptome von Patienten mit M. Hurler und M. Scheie. Es wird diskutiert, ob die Patienten ein Hurler- und ein Scheie-Gen tragen. Die mutierten Gene sind möglicherweise allel und codieren beide die  $\alpha$ -L-Iduronidase. Ergebnis der Doppel-Heterozygotie ist ein mangelhaft produziertes Enzym, die  $\alpha$ -L-Iduronidase. Entsprechend leiden Patienten mit dieser Krankheit vor allem an einer Störung im Dermatansulfat- und Heparansulfatstoffwechsel. Mc. KUSICK 1972 berichtet von einer Patientin mit einem Hurler-Scheie compound, die eine pathologische Mucopolysaccharidurie aufwies. 80% der Gesamt-sMPS-Ausscheidung bestand bei dieser Patientin aus Dermatansulfat. Auch bei unserer Patientin mit dieser Krankheit war die Gesamt-sMPS-Ausscheidung deutlich erhöht. Die Dermatansulfatexcretion erwies sich als hoch pathologisch.

Verschiedene Autorengruppen fanden bei Patienten mit M. Sanfilippo (Typ III) eine erhöhte Gesamt-Mucopolysaccharidurie,

jedoch keine oder nur eine geringe Dermatansulfatausscheidung (MEYER et al. 1958, SANFILIPPO et al. 1963, TERRY and LINKER 1964, BERGGARD and BEARN 1965, FALLIS et al. 1968, GORDON and HAUST 1970, SPRANGER 1970). Die Untersuchung der Urine unserer elf Sanfilippo-Patienten mit den herkömmlichen- und den neuen Methoden ergänzen die Ergebnisse der erwähnten Arbeiten. Die Heparansulfatausscheidung war in allen Fällen stark erhöht. Außerdem ergab aber die Direktbestimmung des Dermatansulfates mit der Methode von DI FERRANTE in acht von elf Fällen Werte im pathologischen Bereich.

Die sMPS-Ausscheidung unseres Patienten mit M. Morquio (Typ IV) war leicht erhöht. Aufgrund der vermehrten Chondroitinsulfatausscheidung bei dieser Krankheit war das Ergebnis zu erwarten. Die bei diesem Mucopolysaccharidosetyp erhöhte Keratansulfaturie wird mit der Carbazol-Methode nicht erfaßt. Die Dermatansulfatexcretion blieb im Normbereich.

Mit unserer verfeinerten Technik bei der Durchführung der Mikroelektrophorese konnten wir nachweisen, daß in der 1,5 M NaCl-Fraktion des Elationsspektrums aus Dowex 1x2 auch Dermatansulfat eluiert wird. In allen Untersuchungen, die sich mit der Dermatansulfatausscheidung befaßten, wurden die Berechnungen aufgrund der Carbazol-empfindlichen Äquivalente nur in der 2,0 M NaCl-Fraktion durchgeführt. Darin ist möglicherweise einer der Gründe zu sehen, weshalb bislang nur geringe Mengen Dermatansulfat im menschlichen Urin vermutet wurden.

#### E) Schlußbemerkung

Die Direktbestimmungen der MPS-Hexuronsäure und des Dermatan-sulfates sind praktisch wichtige, verlässliche, empfindliche und schnelle Suchmethoden. Sie sind vor allem in kleineren Labors zur Vorfeld-Diagnostik von MPS-Thesaurismosen anwendbar. Eine sichere Diagnose des Mucopolysaccharidosetyps erfordert aufwendigere Verfahren. Hier haben sich die säulenchromatographische und elektrophoretische Trennung der Urinmucopolysaccharide bewährt.

## V. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde die Urin-Mucopolysaccharidausscheidung von 211 Kindern verschiedenen Alters untersucht. Zunächst wurde der Gesamt-sMPS-Gehalt anhand des Hexuronsäurewertes mit einer Methode nach SAJDERA 1972 ermittelt. Die Dermatansulfatausscheidung wurde mit einer Methode von DI FERRANTE 1971 gemessen.

Die Ausscheidung dieser sMPS nimmt in Bezug auf den Kreatininwert mit zunehmendem Lebensalter asymptotisch ab.

Die Wertigkeit eines neu eingeführten spot-Testes (MPS-Papers-Schnelltest der Firma Ames) auf saure Urin-Mucopolysaccharide wurde im Vergleich mit dem länger eingeführten BERRY-Test geprüft.

Der MPS-Papers-Schnelltest erwies sich nur als bedingt brauchbar für den Routinebetrieb, weil er falsch negative Ergebnisse liefert. Der BERRY-Test erwies sich dagegen als sehr zuverlässig.

23 der 211 Urine enthielten pathologische sMPS-Mengen, so daß weitere Untersuchungen erforderlich wurden, um eine genaue Diagnose des Mucopolysaccharidosetyps zu erhalten. Die sMPS dieser Urine wurden nach der Cetavlon-Fällung säulenchromatographisch mit Dowex 1x2 qualitativ getrennt. Die Eluate der einzelnen Fraktionen wurden mikroelektronhoretisch auf Celluloseacetat untersucht. Aus der mengenmäßigen Verteilung der

sMPS auf die einzelnen Fraktionen lassen sich empirische Rückschlüsse auf die vorliegende Mucopolysaccharidose ziehen. Die Untersuchungen wurden ergänzt durch Direktbestimmung des Dermatansulfats.

In der 1,5 M NaCl-Fraktion der säulenchromatographischen Eluate aus Dowex 1\*2 konnten Urin-sMPS mikroelektrophoretisch isoliert werden, die eine Wanderungsgeschwindigkeit wie Dermatansulfat zeigten, in der 2,0 M NaCl-Fraktion sMPS mit einer Wanderungsgeschwindigkeit von Referenz-Chondroitin-4-(6)-Sulfat.

Mit der spezifischen Nachweismethodik nach DI FERRANTE wurden höhere Dermatansulfatmengen im Urin gesunder Kinder nachgewiesen als bisher vermutet.

Der spot-Test nach BERRY, die one-sten-Carbozol-Methode zum Nachweis von MPS-Hexuronid sowie die kolorimetrische Bestimmung von Dermatansulfat sind geeignete Suchmethoden in der Vorfeld-Diagnostik der Mucopolysaccharidosen.

## VI. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1) BERGGARD, J., BEARN, A.G.

The Hurler syndrome: a biochemical and clinical study.

Amer. J. Med. 39; 221-229 (1965)

- 2) BERENSON, G.S., DALFERES, E.R.

Urinary excretion of mucopolysaccharides in normal individuals and in the Marfan-syndrome.

Biochim. Biophys. Acta 101; 183-192 (1965)

- 3) BERMAN, E.R., VERED, J., BACH, G.

A reliable spot test for mucopolysaccharides.

Clin. Chem. 17; 886-890 (1971)

- 4) BERRY, H.K., SPINANGER, J.

A paper spot test useful in study of Hurler's syndrome.

J. Lab. Clin. Med. 55; 136-138 (1960)

- 5) BERRY, H.K.

Procedure for testing urine specimens dried on filter paper.

Clin. Chem. 5; 603-608 (1959)

- 6) BITTER, T., MUIR, H.M.

A modified uronic acid carbazole reaction.

Anal. Biochem. 4; 330-334 (1962)

- 7) CHAKRAPANI, E., BACHHAWAT, B.K.

Glycosaminoglycans of human urine: part II -  
sulphated glycosaminoglycans of normal adult urine.

Indian J. Biochem. 6; 166-168 (1969)

- 8) CRADDOCK, J.G., KERBY, G.P.

Urinary excretion of acid mucopolysaccharides by  
diabetic patients.

J. Lab. Clin. Med. 46; 193-198 (1955)

- 9) DAVIDSON, E.A., MEYER, R.

Chondroitin, a new mucopolysaccharide.

J. Biol. Chem. 211; 605-609 (1954)

- 10) DELBRÜCK, A., GRILLE, H., WETTE, K.

Zur Ausscheidung saurer Mucopolysaccharide im Harn.

Klin. Chem. 5; 10-16 (1967)

- 11) DI FERRANTE, N., RICH, C.

The determination of acid aminopolysaccharide in urine.

J. Lab. Clin. Med. 48; 491-494 (1956)

- 12) DI FERRANTE, N., LIPSCOMB, H.S.

Urinary glycosaminoglycans versus creatinine excretion:  
a used and abused parameter.

Clin. Chim. Acta 30; 69-72 (1970)

- 13) DI FERRANTE, N., DONELLY, P.V., BERGLUND, R.K.  
Colorimetric measurement of dermatan sulphate.  
Biochem. J. 124; 549-553 (1971)
- 14) DISCHE, Z.  
A new specific color reaction of hexuronic acids.  
J. Biol. Chem. 167; 189-194 (1947)
- 15) DORFMAN, A., LORINCZ, A.E.  
Occurrence of urinary acid mucopolysaccharides in the  
Hurler syndrome.  
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 43; 443-446 (1957)
- 16) DOUGLAS, G., NOWAK, J., DANES, B.S.  
Mucopolysaccharides in urine during normal human  
development.  
Paediat. Res. 7; 724-727 (1973)
- 17) FALLIS, N., BARNES, F.L., DI FERRANTE, N.  
A case of polydystrophic dwarfism with urinary excretion  
of dermatansulfate and heparansulfate.  
J. Clin. Endocr. 28; 26-33 (1968)
- 18) FRATANTONI, J.C., HALL, C.W., NEUFELD, E.F.  
The defect in Hurler's and Hunter's syndromes:  
faulty degradation of mucopolysaccharide.  
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 60; 699-706 (1968)

- 19) GORDON, B.A., HAUST, M.D.

The mucopolysaccharidoses types I, II and III:

Urinary findings in 23 cases.

Clin. Biochem. 3; 203-215 (1970)

- 20) GREILING, H.

Bestimmungsmethoden von Mucopolysacchariden

und Glycoproteiden.

Glucose 12; 158-182 (1966)

- 21) HERD, K.

Identification of acid mucopolysaccharides by

micro electrophoresis.

Anal. Biochem. 23; 117-121 (1968)

- 22) JEANLOZ, R.W.

The nomenclature of mucopolysaccharides.

Arthr. Rheumat. 3; 233-237 (1960)

- 23) JÓZSA, L., SZABÓ, L.

Urinary hyaluronidase activity in mucopolysaccharidosis.

Acta Paediat. Acad. Sci. Hung. 10; 73-78 (1969)

- 24) KERBY, G.

The excretion of glucuronic acid and of acid

mucopolysaccharides in normal human urine.

J. Clin. Invest. 33; 1168-1174 (1954)

- 25) KIRK, J.K., HARUKI, F.  
Abstr. 6th Intern. Congr. Biochem. New York.  
26.7. - 1.8. 1964
- 26) Mc KUSICK, V.A.  
Heritable disorders of connective tissue.  
Ed. 4, St. Louis 1972
- 27) LAGUNOFF, D., WARREN, G.  
Determination of 2-deoxy-2-sulfoaminohexose content  
of muconolysaccharides.  
Archs. Biochem. Biophys. 99; 396-400 (1962)
- 28) LAGUNOFF, D., PRITZL, P., SCOTT, C.R.  
Urinary-N-sulfate glycosaminoglycan excretion in children:  
normal and abnormal values.  
Proc. Soc. Exp. Biol. 126; 34-38 (1967)
- 29) LANGER, L.D., KRONENBERG, R.S., GORLIN, R.J.  
A case simulating Hurler syndrome of unusual longevity,  
without abnormal muconolysacchariduria.  
Amer. J. Med. 40; 448-457 (1966)
- 30) LANGLEY, W., EVANS, M.  
Determination of creatinine with sodium- 3, 5  
dinitrobenzoate.  
J. Biol. Chem. 115; 333-341 (1936)

- 31) LINKER, A., TERRY, K.O.  
Urinary acid mucopolysaccharides in normal man  
and in Hurler's syndrome.  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 113; 743-746 (1963)
- 32) MANLEY, G., HAWKSWORTH, J.  
Diagnosis of Hurler's syndrome in the hospital laboratory and the determination of its genetic type.  
Arch. Dis. Child. 41; 91-96 (1966)
- 33) MANLEY, G., WILLIAMS, U.  
Urinary excretion of glycosaminoglycans in the various forms of gargoylism.  
J. Clin. Path. 22; 67-75 (1969)
- 34) MAROTEAUX, P., LAMY, M., FOUCHER, M.  
La maladie de Morquio. Etude clinique, radiologique et biologique.  
Presse Méd. 71; 2091-2094 (1963)
- 35) MAROTEAUX, P.  
Die Spät-Hurlersche Erkrankung.  
In: WIEDEMANN, H.-R.: Dysostosen.  
Fischer, Stuttgart 1965
- 36) MAYES, J.S., HANSEN, R.G.  
Mucopolysaccharide excretion in patients with Hurler's

syndrome, their families and normal man.

Proc. Soc. Exp. Biol. 122; 927-931 (1966)

- 37) MEYER, K., GRUMBACH, M.M., LINKER, A., HOFFMAN, P.

Excretion of sulfated muconopolysaccharides in gargoylism  
(Hurler's syndrome).

Proc. Soc. Exp. Biol. 97; 275-279 (1958)

- 38) MURATA, K., ISHIKAWA, T., OSHIMA, Z.

Enzymatic studies of urinary chondroitin sulfates in  
normal and systemic connective tissue disease states.

Clin. Chim. Acta 28; 213-222 (1970)

- 39) ONISAWA, J., LEE, T.Y.

Increased urinary excretion of chondroitin sulfate A  
and C in Hunter's syndrome.

Biochim. Biophys. Acta 208; 144-147 (1970)

- 40) ONISAWA, J., LEE, T.Y.

Biochemical studies of urinary acid mucopolysaccharide-  
peptide complexes in Hurler's syndrome.

Biochem. Med. 3; 404-410 (1970)

- 41) ORII, T.

The urinary acid muconopolysaccharides in normal  
male children.

Hoppe-Seyler Z. Physiol. Chem. 349; 816-822 (1968)

- 42) RECHENBERGER, J.  
Zur alters- und geschlechtsdifferenten Ausscheidung  
saurer Mucopolysaccharide im Harn.  
Z. Altersforschung 14; 314-318 (1960)
- 43) REZVANI, J., COLLIPP, P.J., DI GEORGE, A.M.  
Evaluation of screening tests for urinary  
mucopolysaccharides.  
Pediatrics 52; 64-68 (1973)
- 44) RICH, G., DI FERRANTE, N., ARCHIBALD, R.M.  
Acid mucopolysaccharide excretion in the  
urine of children.  
J. Lab. Clin. Med. 50; 686-691 (1957)
- 45) SACHS, L.  
Angewandte Statistik.  
4. Aufl., Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1974)
- 46) SAITO, H., YAMAGATA, T., SUZUKI, S.  
Enzymatic method for the determination of small  
quantities of isometric chondroitin sulfates.  
J. Biol. Chem. 243; 1536-1542 (1968)
- 47) SAJDERA, S.W.  
One step carbazole reaction.  
Personal communication to Nicola DI FERRANTE (1972)

- 48) SANFILIPPO, S.J., PODOSIN, R., LANGER, L., GOOD, R.A.  
Mental retardation associated with acid mucopolysacchariduria (heparitin sulfate type).  
J. Pediat. 63; 837-838 (1963)
- 49) SCHILLER, S., SLOVER, G.A., DORFMAN, A.  
A method for the separation of acid mucopolysaccharides:  
its application to isolation of heparin from the skin  
of rats.  
J. Biol. Chem. 236; 983-987 (1961)
- 50) SPRANGER, J., WIEDEMANN, H.R.  
Untersuchungen zur Mucopolysaccharidausscheidung bei  
gesunden Kindern und bei Dysostosen.  
Ann. Paediat. 206; 342-355 (1966)
- 51) SPRANGER, J., TODT, H., WIEDEMANN, H.R.  
Untersuchungen zur Zusammensetzung der Urin-Mucopolysaccharide bei Kindern und Erwachsenen.  
Clin. Chim. Acta 17; 142-146 (1967)
- 52) SPRANGER, J., v. GERMAR, R.  
Mucopolysaccharidsuchtest.  
Paediat. Prax. 6; 659-660 (1967)

- 53) SPRANGER, J.

Biochemical definition of the mucopolysaccharidoses.

Z. Kinderheilkunde 108; 17-31 (1970)

- 54) SPRANGER, J.

The systemic mucopolysaccharidoses.

Erg. inn. Medizin und Kinderheilkunde 32; 165-265 (1972)

- 55) TELLER, W.K., BURKE, E.L., ROSEVATER, J.V., Mc KENZIE, B.F.

Urinary excretion of acid mucopolysaccharides in normal children and patients with gargoylism.

J. Lab. Clin. Med. 59; 95-101 (1962)

- 56) TELLER, W., ZIEMANN, A.

Die Säulenchromatographische Fraktionierung der sauren Mucopolysaccharide im Harn.

Klin. Wschr. 19; 1142-1147 (1966)

- 57) TELLER, W., KRÜGER, C.

Fraktionierung der sauren Glycosaminoglycane im Harn von Normalpersonen verschiedenen Alters.

Klin. Wschr. 48; 688-693 (1970)

- 58) TERRY, K., LINKER, A.

Distinction among four forms of Hurler's syndrome.

Proc. Soc. Exp. Biol. 115; 394-402 (1964)

- 59) VARADI, D.P., CIFONELLI, J.A., DORFMAN, A.

The acid mucopolysaccharides in normal urine.

Biochim. Biophys. Acta 141; 103-117 (1967)

- 60) WESSLER, E.

Determination of acid glycosaminoglycans in urine by an ion exchange method. Application to collagenoses, gargoylism, the nail-patella syndrome and Farber's disease.

Clin. Chim. Acta 16; 235-243 (1967)

- 61) WESSLER, E.

Analytical and preparative separation of acid glycosaminoglycans by electrophoresis in barium acetate.

Anal. Biochem. 26; 439-444 (1968)

## VII. L E B E N S L A U F

Am 17. November 1948 wurde ich als Sohn des Pastors Karl Otte und seiner Ehefrau Anna-Gunda geb. Becker in Bordesdahl (Schleswig-Holstein) geboren. Hier wuchs ich gemeinsam mit vier Geschwistern - zwei älteren Brüdern und zwei jüngeren Schwestern - heran. 1957 verzogen wir nach Ratzeburg, wo mein Vater eine Pfarrstelle übernommen hatte.

Seit 1955 ging ich zur Schule, zunächst in die Grundschule, dann in die Lauenburgische Gelehrtenschule in Ratzeburg. In den Oberstufenjahren besuchte ich das Humanistische Gymnasium Katharineum zu Lübeck, wo ich im Frühjahr 1969 das Abitur bestand.

Seit dem Wintersemester 1969/70 studiere ich an der Universität Kiel, zunächst wegen des numerus clausus im Fach Medizin zwei Semester Naturwissenschaften, danach Medizin. Im Wintersemester 1970/71 bestand ich das Vorphysikum, im Wintersemester 1971/72 das Physikum. Das klinische Studium begann ich im Sommersemester 1972 in Heidelberg und setzte es im Wintersemester 1972/73 in Lübeck fort. Seit dem Sommersemester 1973 studiere ich wieder in Kiel. Im Frühjahr 1975 möchte ich an der Universität Kiel das Staatsexamen beginnen.

# VIII. D A N K S A G U N G

Herrn Professor Dr. med. Soranger danke ich sehr herzlich für die Vergabe des Themas dieser Arbeit und die ständige wohlwollende Unterstützung bei ihrer Anfertigung.

Den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau B. Glasow und Frau G. Göpfert danke ich für die Einführung in das klinische Labor und manche Hilfe bei Durchführung der Laborarbeiten.





